

6/19/1

10642759 **Image available**

WPI App No: 1996-139713/194614

XREF App No: C96-043966

XREF App No: N96-116996

Use of defective, recombinant adenovirus carrying suicide**gene - for gene therapy of restenosis by transferring selected genes to smooth muscle cells of atherosclerotic plaque**

Patent Assignee: RHONE-POULENC RORER SA (RHON); RHONE-POULENC RORER SA (RHON); CNRS CENT NAT RECH SCI (CNRS); INST ROUSSY GUSTAVE (INSR)

Inventor: BRANELLEC D; DEDIEU J; DENEFLÉ P; FELDMAN I; PERRICAUDET M; STEG G; DEDIEU J F

Number of Countries: 155 Number of Patents: 011

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9605321	A1	19960101	WO 95FF1074	A	19950810	199614 B
FR 1713697	A1	19960103	FR 9410083	A	19940817	199615
AU 9531694	A	19960307	AU 9531694	A	19950810	199614
NO 9601804	A	19960416	WO 95FF1074	A	19951310	199618
			NO 961504	A	19960416	
CA 9506849	A	19960618	CA 956849	A	19950810	199631
FI 9601666	A	19960606	WO 95FF1074	A	19951310	199639
			FI 961666	A	19960416	
EP 734448	A1	19961001	EP 93927773	A	19950810	199644
			WO 95FF1074	A	19950810	
JP 9504558	W	19970506	WO 95FF1074	A	19950810	199718
			JP 96507070	A	19950810	
AU 9943485	A	19991021	AU 9531694	A	19950810	100015 N
			AU 9943485	A	19990810	
MX 9601368	A1	19960601	MX 961368	A	19960411	100004
AU 743852	B	10011115	AU 9531694	A	19950810	100201 N
			AU 9943485	A	19990810	

Priority Applications (No Type Date): FR 9410083 A 19940817; AU 9943485 A 19990810

Cited Patents: No-Citas.

Patent Details:

Patent No Kind Lan Eg Main IPC Filing Notes

WO 9605321 A1 F 41 C12N-015.86

Designated States (National): AM AU BB BG BR BY CA CN CZ EE FI GE HU IS JP KG KP KR KZ LK LR LT LV ME MG MN MX NO NZ PL RO RU SG SI SK TJ TT UA UG US UZ VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT KE LU MC MW NL OA PT SD SE SG UG

FR 1713697 A1 20 A61K-048/00

AU 9531694 A C12N-015.86 Based on patent WO 9605321

NO 9601804 A C12N-015.86

CA 9506849 A 30 A61K-000/00

FI 9601666 A A61K-000/00

EP 734448 A1 F C12N-015.86 Based on patent WO 9605321

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

JP 9504558 W 36 A61K-048/00 Based on patent WO 9605321

AU 9943485 A C12N-015.86 Div ex application AU 9531694

MX 9601368 A1 C12N-015/86

AU 743852 B C12N-015/86 Div ex application AU 9531694 Previous Publ. patent AU 9943485

Abstract (Basic): WO 9605321 A

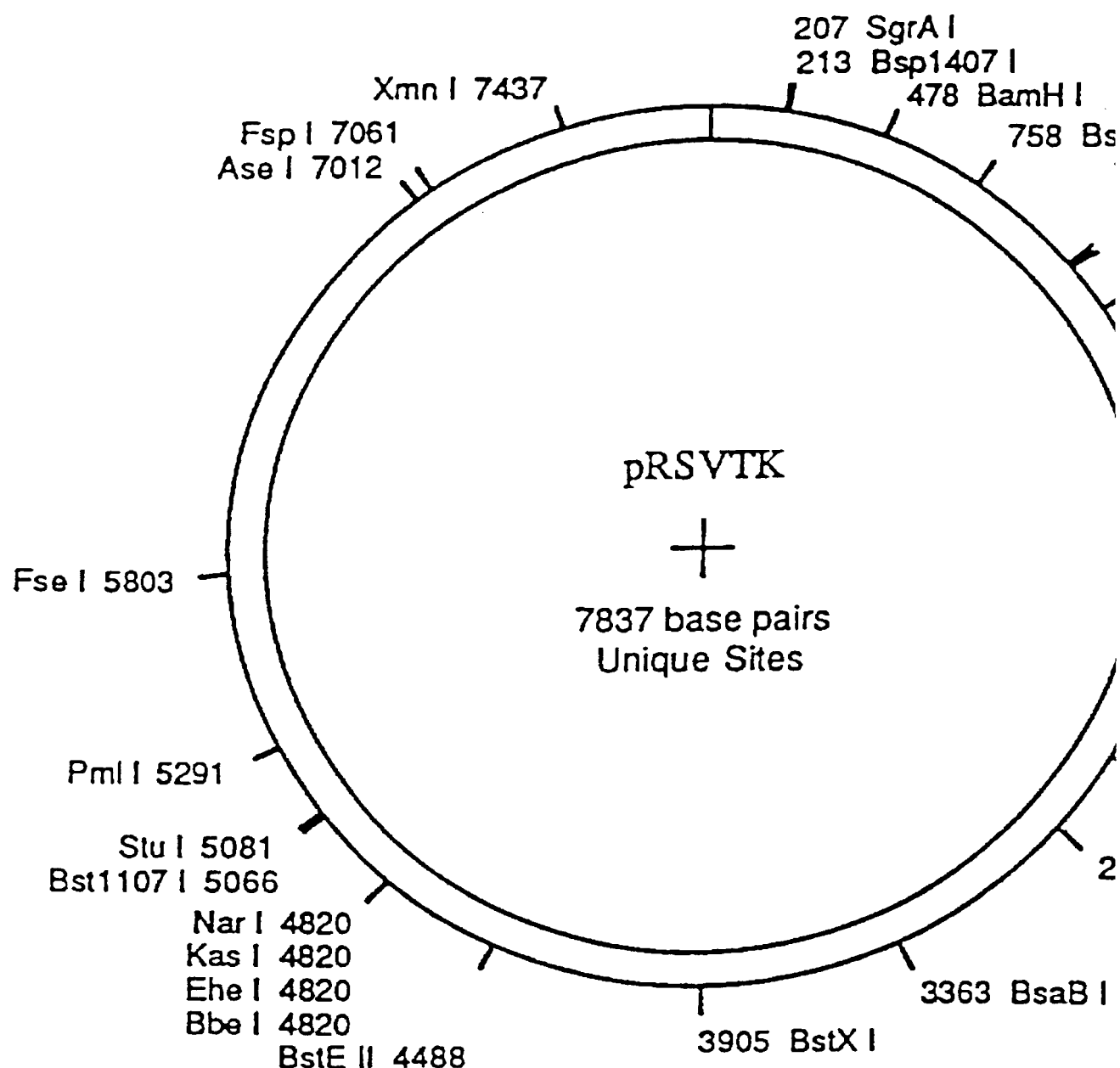
Use of a recombinant, defective adenovirus contg. a suicide gene (A) for the treatment of restenosis, is new.

Also claimed are: (1) a pharmaceutical compsn. contg. a recombinant defective adenovirus imbibed into a hydrogel, and (2) a device for the percutaneous delivery of genes, which comprises a balloon catheter coated with the hydrogel of (1).

USE - The virus can be used to treat restenosis by transferring selected genes to the smooth muscle cells of the atherosclerotic plaque. The genes can be administered percutaneously via a balloon catheter (claimed). Restenosis usually occurs following angioplasty.

ADVANTAGE - The virus very effectively infects proliferating vascular smooth muscle cells, but not other cells, so has a highly selective action. Relatively small quantities of virus are required, the effect is rapid and (A) is expressed at a high level. Since adenoviruses are episomal they do not persist in the cells. The use of a balloon catheter allows precise delivery of the virus to the target lesion.

Dwg.2/4



Title Terms: DEFECT; RECOMBINATION; ADENOVIRUS; CARRY; SUICIDE; GENE; GENE;
THERAPEUTIC; TRANSFER; SELECT; GENE; SMOOTH; MUSCLE; CELL;
ATHEROSCLEROSIS; PLAQUE
Index Terms/Additional Words: GANCICLOVIR;; 5-FLUORO-CYTOSINE;; THYMIDINE;
KINASE;; CYTOSINE; DEAMINASE
Derwent Class: B04; D16; P34
International Patent Class (Main): A61K-000/00; A61K-048/00; C12N-015/86
International Patent Class (Additional): A61K-009/00; A61K-031/70;
A61K-035/76; A61K-038/46; A61L-029/00; A61M-000/00; C07H-021/04;
C07K-014/035; C12N-007/00; C12N-007/01; C12N-009/12; C12N-015/09
File Segment: CPI; EngPI
Manual Codes (CPI/A-N): B04-F1100E; B14-F04; B14-F06; D05-A02B; D05-H12F

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M781 M903 N135 P522 Q233 V500 V560

Chemical Fragment Codes (M6):

02 M903 P522 Q233 R111 R262 R410

Derwent WPI (Dialog® File 351) (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved

© 2002 The Dialog Corporation plc

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PRO
Bureau international



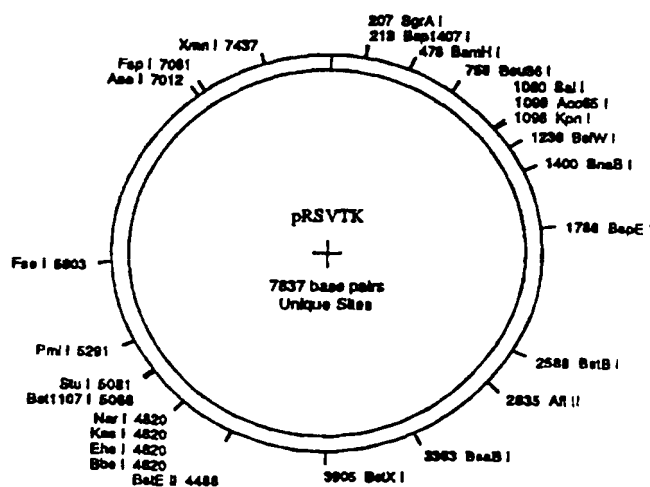
DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE .

WO 9605321A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, A61L 29/00, C12N 7/01, C07K 14/035, C12N 9/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/05321
			(43) Date de publication internationale: 22 février 1996 (22.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01074		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Date de dépôt international: 10 août 1995 (10.08.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/10083 17 août 1994 (17.08.94) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BRANELLEC, Didier [FR/FR]; 1, rue Saint-Benoît, F-94210 La Varenne-Saint-Hilaire (FR). DEDIEU, Jean-François [FR/FR]; 84, quai Jemapes, F-75010 Paris (FR). DENEFFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés-de-Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). FELDMAN, Laurent [FR/FR]; 8, rue de la Neva, F-75017 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). STEG, Gabriel [FR/FR]; 93, rue Jouffroy, F-75017 Paris (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			

(54) Title: GENE THERAPY FOR RESTENOSIS USING AN ADENOVIRAL VECTOR

(54) Titre: THERAPIE GENIQUE DE LA RESTENOSE AU MOYEN DE VECTEUR ADENOVIAL



(57) Abstract

A method for treating restenosis by gene therapy is disclosed, said method comprising delivering a recombinant suicide-gene-containing adenovirus.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une méthode pour le traitement de la resténose par la thérapie génique, comprenant l'administration d'un adénovirus recombinant comportant un gène suicide.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

THERAPIE GENIQUE DE LA RESTENOSE AU MOYEN DE VECTEUR ADENOVIAL

La présente invention concerne une méthode pour le traitement de la resténose par la thérapie génique, comprenant l'administration d'un adénovirus recombinant comportant un gène suicide. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques particulières permettant l'administration locale et efficace des virus recombinants.

L'athérosclérose est une maladie complexe, polygénique, qui est définie sur le plan histologique par des dépôts (plaques lipidiques ou fibro-lipidiques) de lipides et d'autres dérivés sanguins dans la paroi des grosses artères (aorte, artères coronaires, carotide). Ces plaques, plus ou moins calcifiées selon l'avancement du processus, peuvent être jumelées à des lésions et sont liées à l'accumulation dans les artères de dépôts graisseux constitués essentiellement d'esters de cholestérol. Ces plaques s'accompagnent d'un épaississement de la paroi artérielle, avec hypertrophie du muscle lisse, apparition de cellules spumeuses et accumulation de tissu fibreux. La plaque athéromateuse est très nettement en relief sur la paroi, ce qui lui confère un caractère sténosant responsable des occlusions vasculaires par athérome, thrombose ou embolie qui surviennent chez les patients les plus atteints. Ces lésions peuvent donc conduire à des pathologies cardio-vasculaires très graves telles que l'infarctus, la mort subite, l'insuffisance cardiaque, les accidents cérébro-vasculaires, etc.

Depuis 1977, la technique d'angioplastie a été développée pour permettre une intervention non chirurgicale au niveau de la plaque d'athérosclérose. Cependant, le traitement d'une lésion athéroscléuse par angioplastie résulte de façon très fréquente (jusqu'à 50% des cas dans certaines études) en une resténose consécutive à la blessure mécanique de la paroi artérielle. Un événement clef de ce mécanisme est la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média vers l'intima, notamment du fait de l'absence de protection et/ou de rétrocontrôle exercé par les cellules endothéliales de l'intima.

Le traitement de la resténose par administration de substances chimiques ou protéiques capables de tuer les cellules musculaires lisses vasculaires a été proposé dans l'art antérieur. Ainsi, des dérivés de psolarènes, incorporés par les cellules prolifératives et sensibilisant alors ces cellules à l'action de la lumière, ont été utilisés (March et al, 1993, circulation, 87:184-191). De même, certaines cytotoxines

constituées d'une protéine de fusion entre un fragment de toxine de plante ou bactérienne et un facteur de croissance ont également été utilisées (Pickering et al, J. Clin. Invest., 1993, 91:724-729; Biro et al, 1992, Circ. Res., 71:640-645; Casscells et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1992, 89:7159-7163). Cependant, ces traitements
5 présentent de nombreux inconvénients, tels que leur faible spécificité, leur efficacité moyenne, un délai d'action important et une toxicité potentielle.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ce problème. La présente invention fournit en effet une méthode particulièrement efficace et sélective pour le traitement de la resténose post-angioplastie par la thérapie génique. La
10 méthode de la présente invention consiste principalement à administrer un adénovirus recombinant comportant un gène suicide, capable de sensibiliser spécifiquement les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération à un agent thérapeutique. L'administration simultanée ou subséquente de cet agent thérapeutique entraîne alors la mort sélective des cellules sensibilisées.

15 Les avantages de la présente invention résident notamment dans la forte capacité des adénovirus de l'invention à infecter les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération. Ceci permet d'utiliser des quantités relativement faibles de principe actif (adénovirus recombinant), et permet également une action efficace et très rapide sur les sites à traiter. Les adénovirus de l'invention sont également capables
20 d'exprimer à très hauts niveaux les gènes suicides introduits, ce qui leur confère une action thérapeutique très efficace. De plus, en raison de leur caractère épisomal, les adénovirus de l'invention ont une persistance limitée dans les cellules prolifératives et donc un effet transitoire parfaitement adapté à l'effet thérapeutique recherché. Enfin, la demanderesse a également mis au point une méthode d'administration particulièrement
25 avantageuse qui permet d'infecter avec une grande efficacité certaines cellules cibles essentielles à l'effet thérapeutique recherché.

Un premier objet de l'invention concerne donc l'utilisation d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide pour la préparation d'une
30 composition pharmaceutique destinée au traitement de la resténose.

Comme indiqué ci-avant, on entend au sens de la présente invention par gène suicide tout gène dont le produit d'expression confère à la cellule infectée une sensibilité à un agent thérapeutique. A titre d'exemple, on peut citer le gène de la
35 thymidine kinase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une

sensibilité à certains agents thérapeutiques tels le ganciclovir ou l'acyclovir, ou le gène de la cytosine désaminase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluoro-cytosine (5-FC).

La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est capable de phosphoryler
5 les analogues de nucléosides tels que l'acyclovir et le ganciclovir. Ces molécules modifiées peuvent être incorporées dans une chaîne d'ADN en cours d'élongation, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ADN, entraînant la mort de la cellule (F.L. Moolten, Cancer Res. 46 (1986) 5276). Cette stratégie permet ainsi d'éliminer spécifiquement les cellules exprimant le gène TK. De plus, la synthèse d'ADN étant la
10 cible de la toxicité, seules les cellules en cours de division sont affectées.

Plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (hTK HSV-1). La séquence de ce gène a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight et al., Nucleic Acid. Res. 8 (1980) 5931). Il est également possible d'utiliser des dérivés de cette
15 séquence présentant une plus grande spécificité de substrat ou une meilleure activité kinase. De tels dérivés peuvent en particulier être obtenus par mutagenèse au niveau du site de liaison comme décrit précédemment (Balasubramaniam et al., J. Gen. Virol. 71 (1990) 2979; Munir et al., JBC 267 (1992) 6584).

Il est également possible d'utiliser le gène de la cytosine désaminase, dont le
20 produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluoro-cytosine (5-FC). La cytosine désaminase est capable de catalyser la désamination de la cytosine en uracile. Les cellules qui expriment ce gène sont donc capables de convertir la 5-fluoro-cytosine (5-FC) en 5-fluoro-uracile (5-FU), qui est un métabolite toxique.
25 La séquence de ce gène a été décrite dans la littérature (Anderson et al. Arch. Microbiol. 152 (1989) 115).

Plus généralement, tout gène capable de conférer aux cellules infectées une sensibilité à un agent thérapeutique peut être utilisé dans le cadre de la présente invention. Le gène de la thymidine kinase constitue un mode de réalisation
30 particulièrement avantageux.

Pour la construction des adénovirus selon l'invention, différents sérotypes peuvent être utilisés. Il existe en effet de nombreux sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère cependant utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de
35 type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93

05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mavl, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus selon l'invention sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène suicide. Préférentiellement, l'adénovirus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et le gène suicide. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes.

Plus préférentiellement on utilise un adénovirus défectif, rendu non fonctionnel par une délétion totale ou partielle de la région E1 et une délétion dans la région E4. La région E4 comprend 7 phases de lecture. La délétion dans la région E4 peut être transcomplémentée par la présence, dans la lignée cellulaire servant à la multiplication des virus, soit simplement de la phase de lecture ORF6 soit des phases de lecture ORF6 et ORF6/7.

Les adénovirus préférés selon l'invention sont choisis parmi les suivants :

-Adénovirus recombinant défectif $\Delta E1$, $\Delta E4$ comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de tout ou partie de la région E4.

-Adénovirus recombinant défectif $\Delta E1$, $ORF3^-$, $ORF6^-$, comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 de la région E4.

5 -Adénovirus recombinant défectif $\Delta E1$, $\Delta E4$, $ORF1^+$ comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF1. Plus spécifiquement la délétion dans la région E4 a son extrémité 5' comprise dans la phase de lecture ORF7 et son extrémité 3' comprise dans la phase de lecture ORF2. Par exemple dans la région couvrant les nucléotides 33093-35053.

10 -Adénovirus recombinant défectif $\Delta E1$, $\Delta E4$, $ORF4^+$ comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF4. Plus particulièrement deux délétions sont faites, l'une dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF6, l'autre dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF3 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF1
15 ou dans la région promotrice de E4. Par exemple une délétion couvrant les nucléotides 33093-33695 et une délétion couvrant les nucléotides 34634-35355.

-Adénovirus recombinant défectif $\Delta E1$, $\Delta E4$, comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion couvrant la totalité de la région E4 choisie
20 par exemple parmi les délétions suivantes : nucléotides 32720-35835, ou 33466-35355, ou 33093-35355.

La construction de ces vecteurs est décrite dans les brevets n° FR 9500749 et n°FR 9506532

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés
25 par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573, Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre le gène suicide. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La
30 lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J Gen Virol. 36 (1977) 59) qui contient
35 notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus

Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

5

Avantageusement, dans les adénovirus de l'invention, le gène suicide est placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les cellules infectées. Il peut s'agir du propre promoteur du gène suicide, d'un promoteur hétérologue ou d'un promoteur synthétique. Notamment, il peut s'agir de promoteurs issus de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du
10 génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences
15 d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules musculaires lisses vasculaires, de manière à ce que le gène suicide ne soit exprimé et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule musculaire lisse vasculaire. Parmi les
20 promoteurs actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules musculaires lisses vasculaires on peut citer notamment le promoteur de l'actine α du muscle lisse.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise un adénovirus recombinant défectif comprenant un gène suicide sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV ou le promoteur précoce du
25 CMV.

Selon un autre mode avantageux, il s'agit d'un promoteur actif spécifiquement ou majoritairement dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace
30 pour le traitement de la resténose. Par ailleurs, pour augmenter encore l'efficacité et la spécificité du traitement, la demanderesse a mis au point une méthode permettant une administration locale des adénovirus recombinants au niveau des sites à traiter. Plus particulièrement, cette méthode repose sur l'utilisation d'un ballon d'angioplastie enrobé d'un film hydrophile (par exemple un hydrogel) imbibé d'adénovirus, qui peut

ainsi être appliqué de manière précise sur le site à traiter, et permettre une libération locale et efficace des adénovirus au niveau des cellules à traiter.

En outre, la demanderesse a montré que, sur des artères saines, cette méthode d'administration permettait d'infecter un pourcentage élevé de cellules de la média
5 (jusqu'à 9,6%), qui sont les cibles les plus logiques pour la prévention de la resténose.

De manière tout à fait avantageuse, la demanderesse a également montré que les virus et la méthode selon l'invention permettaient un transfert efficace et sélectif de gènes dans une artère athéromateuse. Plus particulièrement, la demanderesse a démontré pour la première fois la capacité des adénovirus de transférer un gène
10 thérapeutiquement efficace dans une artère athéromateuse. Ceci est tout à fait essentiel puisque l'efficacité thérapeutique du traitement de la resténose passe par la démonstration de la capacité à transférer le gène thérapeutique, dans les bonnes cellules et avec une efficacité appropriée, dans les conditions physiopathologiques. Les artères athéromateuses sont caractérisées par la présence au niveau de l'intima (i) de
15 dépôts de matrice extracellulaire, (ii) de dépôts lipidiques constitués essentiellement de cellules spumeuses de type macrophagique et (iii) de cellules musculaires lisses en prolifération.

Les résultats présentés ci-après montrent que, dans ces artères athéromateuses, les virus selon l'invention permettent un pourcentage d'infection
20 moindre mais d'une plus grande spécificité (compte tenu de fait de la présence de cellules de type macrophagique dans ce cas, les cellules macrophagiques n'étant pas transduites) et s'accompagnant d'une efficacité thérapeutique importante. Les résultats obtenus montrent notamment un transfert très sélectif de l'adénovirus dans les cellules cibles, c'est à dire les cellules musculaires lisses en prolifération. Sur l'ensemble de la
25 population cellulaire présente au niveau de la zone athéromateuse, plus de 95% des cellules infectées sont des cellules musculaires lisses vasculaires. Ainsi, les cellules macrophagiques présentes au niveau de l'intima ne sont pas infectées du tout (aucune cellule macrophagique infectée n'a été détectée). S'agissant des cellules musculaires lisses en prolifération (dans la néointima), le traitement selon l'invention permet
30 d'infecter un pourcentage inférieur à 1% (0.2% par exemple). Ceci est bien inférieur aux résultats décrits antérieurement dans des artères saines ou présentant des lésions de la paroi mais qui ne représentent pas une situation physiopathologique de la resténose (abrasion endothéliale d'une artère saine). La demanderesse a également montré que l'infection de ce faible pourcentage de cellules permettait néanmoins un
35 effet thérapeutique important, mis en évidence notamment par la mesure du diamètre

luminal. Ce résultat est particulièrement surprenant et implique l'existence d'un effet cytotoxique induit (effet "by-stander") in vivo. L'invention décrit donc pour la première fois une méthode permettant le transfert sélectif de gènes dans les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération dans une artère athéromateuse
5 comprenant l'administration dans ladite artère d'un adénovirus recombinant défectif contenant ledit gène au moyen d'un cathéter à ballonnet d'angioplastie. Le terme transfert sélectif implique un transfert essentiellement dans les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération et pas de transfert dans les cellules macrophagiques environnantes. Cette méthode permet un traitement de la resténose par transfert d'un
10 gène suicide tel que le gène TK puis traitement par le gancyclovir ou l'acyclovir par exemple. Cette méthode de traitement est en outre caractérisée par un effet de toxicité induite in vivo.

Un autre objet de la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif et un hydrogel. Plus
15 spécifiquement, l'invention concerne une composition comprenant un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide, et un hydrogel. L'hydrogel utilisé dans le cadre de la présente invention peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme
20 notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux.

La méthode de traitement de l'invention consiste donc avantageusement à introduire, au niveau du site à traiter, une composition comprenant un hydrogel imbibé
25 d'adénovirus recombinants. L'hydrogel peut être déposé directement sur la surface du tissu à traiter, par exemple au cours d'une intervention chirurgicale. Avantageusement, l'hydrogel être introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter, par exemple d'un cathéter à ballonnet, notamment lors de l'angioplastie, ce qui permet d'éviter tout traumatisme supplémentaire du à une nouvelle intervention au site d'angioplastie. De
30 manière particulièrement avantageuse, l'hydrogel imbibé est introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter à ballonnet, protégé par un manchon. Comme décrit dans les exemples, l'hydrogel présente de nombreux avantages : il permet d'améliorer le glissement du ballonnet ce qui lui permet de passer par des artères fortement sténosées. De plus l'hydrogel est utilisable avec n'importe quel type de ballonnet
35 d'angioplastie ce qui permet en particulier d'utiliser des ballonnet à perfusion. Ainsi,

selon un mode particulier de réalisation, les adénovirus selon l'invention sont administrés au moyen de ballonnets à perfusion, en particulier de catheters à ballonnet à canaux ("channelled balloon angioplasty cathéter", Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Watertown, MA). Ce dernier est constitué d'un ballonnet conventionnel recouvert d'une couche de 24 canaux perforés qui sont perfusés par un lumen indépendant à travers un orifice d'infusion supplémentaire. Ces ballonnets à perfusion qui permettent de maintenir un flux sanguin et ainsi de diminuer les risques d'ischémie du myocarde, lors du gonflement du ballonnet, permettent également de délivrer localement un médicament à pression normale, pendant un temps relativement long, plus de vingt minutes, qui est nécessaire pour une infection optimale.

Il est particulièrement intéressant d'utiliser un cathéter à ballonnet à perfusion enrobé d'hydrogel. Dans ce cas on cumule les avantages des deux c'est à dire ; la possibilité de garder le ballonnet gonflé pendant une période de temps plus longue tout en gardant les propriétés de glissement facilité et de site-spécificité de l'hydrogel. On obtient dans ce cas une efficacité d'infection optimale.

Les résultats présentés dans les exemples démontrent en effet l'efficacité de ce système pour le transfert percutané de gènes dans les parois artérielles

Un autre objet de la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif et du poloxamère. Plus spécifiquement, l'invention concerne une composition comprenant un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide, et du poloxamère. Le poloxamère 407 est un polyol biocompatible non toxique, il est disponible dans le commerce (BASF, Parsippany, NJ).

Une méthode de traitement de l'invention consiste donc avantageusement à introduire, au niveau du site à traiter, une composition comprenant du poloxamère imbibé d'adénovirus recombinants. Le poloxamère peut être déposé directement sur la surface du tissu à traiter, par exemple au cours d'une intervention chirurgicale. Avantageusement, le poloxamère être introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter, par exemple d'un cathéter à ballonnet, notamment lors de l'angioplastie, ce qui permet d'éviter tout traumatisme supplémentaire du à une nouvelle intervention au site d'angioplastie. De manière particulièrement avantageuse, le poloxamère imbibé est introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter à ballonnet, protégé par un manchon. Le poloxamère présente essentiellement les mêmes avantages que l'hydrogel tout en ayant une viscosité moindre.

Il est particulièrement intéressant d'utiliser un cathéter à ballonnet à perfusion enrobé de poloxamère en particulier de cathéters à ballonnet à canaux. Dans ce cas on cumule les avantages des deux c'est à dire : la possibilité de garder le ballonnet gonflé pendant une période de temps plus longue tout en gardant les propriétés de glissement facilité et de site-spécificité du poloxamère. On obtient dans ce cas aussi une efficacité d'infection optimale.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

10 Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pONT-tk

Figure 2 : Représentation du vecteur pRSV-tk

Figure 3 : Effet cytotoxique de la combinaison ganciclovir/Ad-LTR-tk sur cellules musculaires lisses en culture.

15 Figure 4 : Réduction de la resténose par transfert adénoviral du gène tk et administration de ganciclovir.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis
20 T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

30 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1. Construction du vecteur Ad-LTR-TK portant le gène TK sous le contrôle du promoteur du LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV) (figure 1).

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) sous le contrôle d'un promoteur viral (promoteur LTR-RSV). Cet adénovirus a été construit par recombinaison homologue entre l'adénovirus déficient Ad-dl1324 et le plasmide pRSVtk portant le gène tk sous contrôle du promoteur RSV (exemple 1.3.). Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.1.), par substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur RSV (exemple 1.2.).

1.1. Construction du plasmide pONTtk

a) Construction du plasmide p7tk1

Cet exemple décrit la construction du plasmide p7tk1 contenant la phase ouverte de lecture du gène tk de 1131 paires de bases (ATG 114-116 et codon stop TGA 1242-1244), insérée dans un multisite de clonage.

Le fragment BglII-NcoI contenant le gène de la thymidine kinase (tk) du virus
5 herpès simplex type 1 a été isolé à partir du plasmide pHSV-106 (commercialisé par Gibco BRL), réparé par l'action du fragment klenow puis inséré au site SmaI du plasmide pGEM7zf(+) (commercialisé par Promega). Les sites SmaI et BglII sont détruits lors de cette étape, le site NcoI est conservé.

Le plasmide obtenu a été désigné p7tk1.

10

b) Construction du plasmide pONT1

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un promoteur chimère constitué d'une séquence nécessaire à la transactivation par l'antigène EBNA1 et du promoteur TP1 du virus EBV.

15

Le fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) du virus EBV a été isolé à partir de la souche B95-8. La séquence complète du virus EBV a été décrite par Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). Ce fragment contient les séquences nécessaires à la transactivation par l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, vol. 6 pp. 3838-3846). Ce fragment a ensuite été
20 fusionné au fragment NruI(166 241)-PstI(166 559) de l'EBV B95-8 (le site PstI a été digéré par la polymérase T4), contenant le promoteur TP1. Le promoteur chimère ainsi obtenu a ensuite été inséré dans le multisite de clonage du plasmide pBluescript II SK pour générer le plasmide pONT1.

20

c). Construction du plasmide pONTtk

25

Le plasmide pONTtk comporte le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) cloné dans le plasmide p7tk1, sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 cloné dans le plasmide pONT1.

30

Pour construire ce plasmide, le fragment BamHI-XhoI de pONT1 qui contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2, et le fragment XhoI-ClaI de p7tk1 qui contient la phase ouverte de lecture de tk ont été clonés aux
sites BamHI (478) et ClaI (4550) du plasmide pAd.RSVbGal. Le plasmide pAd.RSVbGal contient, dans l'orientation 5'→3',

30

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et
35 l'amplificateur E1A;

- le gène codant pour la b-galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),
- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSVbGal et l'adénovirus dl324. Le plasmide pAd.RSVbGal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Tous les sites de clonage sont conservés. Le plasmide obtenu a été désigné pONTtk.

1.2. Construction du plasmide pRSVtk

- 10 Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.1.), par substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur RSV. Pour cela, le promoteur RSV a été isolé sous forme d'un fragment BamHI-Sall à partir du plasmide pAd.RSV.βgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), puis cloné aux sites BamHI(478) et Sall(1700) du plasmide pONTtk. Le plasmide
- 15 résultant a été désigné pRSVtk (figure 1).

1.3. Construction de l'adénovirus recombinant Ad-RSV-tk

- Le vecteur pRSVtk a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.
- 20

- Plus précisément, l'adénovirus Ad-RSV-tk a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pRSVtk, selon le protocole suivant : le plasmide pRSVtk, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-dl324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-
- 25 transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre
- 30 d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-RSV-tk peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2 : Activité d'un adénovirus selon l'invention en présence de ganciclovir sur les cellules musculaires lisses en culture.

L'activité de l'adénovirus contenant le gène TK préparé dans l'exemple 1 a été
5 contrôlée sur des modèles in vitro de cellules musculaires lisses. Pour cela, les cellules musculaires lisses isolées à partir d'aorte de rat et de lapin ont été infectées par l'adénovirus recombinant Ad-RSV-tk, et incubées en présence de ganciclovir. L'effet de la combinaison Ad-RSV-tk/ganciclovir sur la viabilité cellulaire est ensuite confirmé par test colorimétrique MTT, 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
10 bromide, selon la technique décrite par Mosman (J.Immunol.Meth. 65 (1983) 55), ou de manière plus précise par comptage cellulaire. Brièvement, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont mises en culture par digestion enzymatique d'aorte de lapin NZW selon une méthode adaptée de Chamley et al. (Cell Tissue Res. 177 : 503-522 1977). Les cellules sont maintenues en
15 présence de 20% de sérum de veau foetal et utilisées pour l'ensemble des tests (cf. infra) avant le dixième passage. Dans l'ensemble de nos expériences, les cellules musculaires lisses sont caractérisées par immunomarquage à l'aide d'anticorps anti- α SM-actine (Sigma).

Afin de mesurer l'activité cytotoxique de la combinaison Ad-RSV-
20 TK/ganciclovir, les CMLV d'aorte de lapin sont incubées en présence de l'adénovirus dilué dans du milieu de culture (DMEM, 0,5% SVF). Après environ une heure à 37°C en atmosphère humide, le milieu contenant la solution adénovirale est aspiré et remplacé par du milieu de culture (DMEM, 0,5% SVF) pour une période de 18 à 24 heures. Différentes concentrations de ganciclovir sont alors ajoutées dans un milieu
25 riche en SVF (10%). Quatre jours après l'addition du ganciclovir, les cellules sont dénombrées (100% de la viabilité cellulaire correspondant aux cellules non transduites par Ad-RSV-TK et non traitées par le ganciclovir).

La combinaison Ad-RSV-TK/ganciclovir induit un effet cytotoxique vis-à-vis des CMLV de lapin (cf. Figure 3). Cette cytotoxicité varie en fonction de la
30 concentration de ganciclovir et de la multiplicité d'infection d'Ad-RSV-TK. Dans nos conditions expérimentales i.e. quatre jours d'incubation en présence de 10% SVF, la combinaison Ad-RSV-TK (M.O.I. 1000)/ganciclovir (25 μ M) entraîne une cytolysse totale. Dans ces conditions expérimentales où une forte multiplicité d'infection permet de transduire la majorité des cellules, la CI50 est 0,3 μ M. A faible multiplicité
35 d'infection (M.O.I. 10), la CI50 est inférieure à 5 μ M. Ainsi, les concentrations de

ganciclovir actives *in vitro*, sur CML, sont compatibles avec une utilisation thérapeutique. En effet, chez les patients traités pour infection virale par une dose non toxique de ganciclovir, il est possible d'atteindre des concentrations plasmatiques supérieure à 15 μ M (Paul et Dummer, Am.J.Med.Sci. 4 : 272-277, 1992).

- 5 En outre, cette étude *in vitro* démontre qu'il est possible d'induire un effet cytotoxique majeur en dépit d'un faible pourcentage de transduction par l'adénovirus Ad-RSV-TK. La présence de la protéine HSV-TK a été mise en évidence par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de HSV-TK (anticorps monoclonal 4C8, Yale University). Dans les CMLV de lapin (et
- 10 humaines) traitées par Ad-RSV-TK, la localisation de la protéine TK est cytoplasmique mais également nucléaire. Nous avons ainsi montré que l'utilisation d'une multiplicité d'infection de 10 est associée à une transduction de moins de 5% des CMLV. De manière générale, à multiplicité d'infection équivalente, le pourcentage de cellules transduites par Ad-RSV-TK est similaire à celui obtenu à l'aide d'un
- 15 adénovirus contrôle codant pour la β -galactosidase (ex. : plus de 90% de cellules transduites à multiplicité d'infection 1000). Ces données démontrent donc que la transduction de moins de 5% de CMLV entraîne une cytotoxicité importante en présence d'une concentration optimale de ganciclovir (cf. figure 3 : baisse de 80% de la viabilité cellulaire à 25 μ M). L'immunodétection de la protéine HSV-TK illustre
- 20 donc l'importance de l'effet "bystander" observé sur les CMLV traitées par la combinaison Ad-RSV-TK/ganciclovir. Cet effet "bystander" peut avoir sa contrepartie *in vivo*. En particulier, ces données suggèrent fortement qu'un transfert limité d'adénovirus Ad-RSV-TK, notamment dans une artère pathologique, peut aboutir à une réduction significative de la masse néointimale, riche en CML et responsable de la
- 25 resténose chez le patient.

D'autre part, l'effet cytolytique est sélectif puisque ni le simple traitement par ganciclovir ni la transduction par Ad-RSV-TK *per se* n'est associé à une mort cellulaire. La cytotoxicité de l'association Ad-RSV-TK/ganciclovir a été confirmée par le test colorimétrique MTT.

- 30 Enfin, des résultats similaires, à savoir une toxicité sélective en présence de ganciclovir et d'adénovirus, ont été observés sur culture primaire de cellules musculaires lisses humaines.

Ces données mettent donc en évidence le blocage efficace de la prolifération de CMLV *in vitro* par Ad-RSV-TK.

Exemple 3 : Transfert artériel d'un adénovirus recombinant par voie percutanée

Cet exemple décrit la mise au point d'une technique particulièrement efficace pour le transfert de gènes par voie percutanée. Cette technique repose sur l'utilisation d'un cathéter à ballonnet à hydrogel. Les résultats présentés montrent que, de manière
5 tout à fait avantageuse, cette technique permet d'infecter efficacement certaines populations cellulaires privilégiées, notamment pour le traitement de la resténose.

Cet exemple a été réalisé au moyen d'un adénovirus recombinant déficient
10 comprenant le gène de la β -galactosidase d'E.coli sous le contrôle du promoteur du RSV-RSV et d'un signal de localisation nucléaire. La construction de cet adénovirus a été décrite notamment dans Stratford-Perricaudet et al., (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Les expériences ont été réalisées sur des lapins blancs de Nouvelle Zélande anesthésiés à l'acépromazine et maintenus sous pentobarbital. Le transfert de gène a
15 été effectué au niveau de l'artère iliaque externe.

L'adénovirus Ad-RSV. β -Gal ($1-2 \cdot 10^{10}$ pfu dans 100 μ l de tampon phosphate) a été déposé sur un cathéter à ballonnet préalablement enduit d'hydrogel (Hydroplus, Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Watertown, MA) (Riessen et
20 al., Hum. Gene Ther. 4 (1993) 749). Le cathéter utilisé est un cathéter à ballonnet de 2 cm de longueur, et de diamètre compris entre 2,5 et 3 mm. Le cathéter a ensuite été introduit, en utilisant un manchon protecteur, dans l'artère fémorale droite. Une pression de une atmosphère a ensuite été appliquée, puis le cathéter a été dirigé jusqu'à l'artère iliaque externe où une pression de 6 atmosphères a alors été appliquée au
25 ballonnet pendant 30 minutes. Cette expérience a été réalisée sur 27 lapins. 3 à 28 jours après l'administration, les animaux ont été sacrifiés par overdose de pentobarbital.

Transfert et expression du gène dans la paroi artérielle

30 Les artères des animaux sacrifiés ont été isolées, et l'expression de la β -galactosidase a été détectée par coloration en présence de X-gal selon la technique de Sanes et al (EMBO J. 5 (1986) 3133). Pour chaque animal, deux segments artériels au moins ont été soit montés sur OCT (Laboratoires Miles Inc., IL) pour des expériences
35 de cryosection, ou enduit de paraffine, coupés en sections de 6 μ m et contrecolorés à

l'hématoxyline et l'éosine. L'expression a été considérée comme positive seulement lorsqu'une coloration bleu foncé était observée dans le noyau. Les résultats obtenus montrent clairement que les artères des animaux infectés présentent une coloration bleu caractéristique de la β gal. Une analyse microscopique révèle qu'il n'y a pas d'endothélium intact résiduel, mais que la continuité de la lamina élastique interne est
5 préservée. L'analyse microscopique montre également que les cellules de la média ont été infectées par les adénovirus et expriment le gène transféré. Plus précisément, alors que dans le cas d'une administration par cathéter à double ballonnets, 0,4% seulement des cellules de la média ont été infectées, 9,6% le sont en utilisant un cathéter à
10 ballonnet enduit d'hydrogel (voir analyse morphométrique ci-après). De plus, les 9,6 % sont calculés par rapport à l'épaisseur totale de la média mais dans les couches superficielles de la média, 100% des cellules sont infectées. Ces résultats sont bien supérieurs à ceux obtenus avec les cathéters à double ballonnets, ou par transfert de gène nu ou au moyen de liposomes. Ces expériences démontrent combien les
15 adénovirus peuvent constituer un vecteur particulièrement avantageux pour l'administration de gènes suicides en vue du traitement de la resténose.

Analyse morphométrique

20 L'efficacité de transfert a été déterminée sur 7 lapins traités. Tous ces animaux ont reçu $5 \cdot 10^9$ pfu d'adénovirus pour infecter un segment artériel de 2 cm de longueur, de telle sorte que la multiplicité d'infection est similaire pour chaque animal. Pour chaque artère iliaque transfectée, deux segments sériés de 5 mm de longueur ont été prélevés de la zone cible et, pour chaque segment, au moins trois sections au
25 hasard ont été examinées au microscope optique après coloration au X-gal. Sur chaque section, l'efficacité de transfert a été déterminée par le rapport des cellules de la média colorées sur le nombre total des cellules de la média. Au total, plus de $30 \cdot 10^3$ cellules provenant des artères infectées par les adénovirus (48 sections) ont été comptées. Le pourcentage moyen de cellules de la média infectées est de 4,02%, avec
30 des valeurs pouvant atteindre 9,6%. Dans le cas d'un transfert par cathéter à double ballonnet, le pourcentage moyen est seulement de 0,18%.

Cinétique d'expression

Pour déterminer la durée de l'expression du gène transféré par les adénovirus selon l'invention, une étude de l'expression de la β -gal a été réalisée au cours du temps sur 20 lapins traités soit par cathéter à double ballonnet (10 animaux), soit par cathéter à ballonnet imbibé d'hydrogel (10 animaux). Pour chaque groupe, 2 animaux ont été sacrifiés au jour 3, 7, 14, 21 et 28. L'expression a été détectée par examens macroscopique et microscopique d'artères colorées au X-gal comme décrit plus haut. Les résultats obtenus montrent, pour chaque groupe, une expression stable pendant 14 jours, suivie d'une baisse à 21 jours. Aucune expression n'est détectée à 28 jours. La même cinétique a pu être mise en évidence dans une artère pathologique dans le modèle de lapin athéromateux. Ces résultats confirment l'effet transitoire des vecteurs de l'invention, particulièrement avantageux et adapté au traitement de la resténose notamment au niveau des parois athéromateuses.

Sélectivité du transfert et de l'expression au niveau des parois artérielles

15

Afin de contrôler la dissémination possibles à d'autres tissus des adénovirus injectés, dans tous les animaux sacrifiés 3 jours après l'injection, des échantillons de tissu provenant du foie, cerveau, testicules, coeur, poumon, rein, et muscle squelettique, ainsi qu'un segment artériel adjacent au site traité ont été prélevés immédiatement après le sacrifice. Sur chaque échantillon, le transfert et l'expression du gène ont été mis en évidence par PCR (au moyen de sondes dirigées contre le gène codant pour la protéine IX de l'adénovirus et contre le gène lacZ) et histochimie. Les résultats obtenus montrent que aucun des échantillons prélevés à partir des animaux traités par cathéter à ballonnets enduits d'hydrogel, ne présente de coloration dans les tissus testés. De la même manière, aucune présence de virus n'a pu être détectée par PCR dans les échantillons testés, même en utilisant un protocole optimisé et très sensible de 45 cycles d'amplifications.

Ces résultats démontrent l'efficacité du mode d'administration selon l'invention pour délivrer de manière très locale les gènes thérapeutiques.

30

Exemple 4 : Transfert artériel de l'adénovirus Ad-RSV-TK.

Cet exemple démontre les propriétés de l'adénovirus-TK de l'invention pour le traitement de la resténose par transfert sélectif dans une artère athéromateuse.

35

Modèle animal :

L'efficacité du transfert artériel a été évaluée dans un modèle de resténose chez le lapin blanc de Nouvelle Zélande. Les lapins ont été préalablement soumis à un régime riche en cholestérol (1%) pendant deux semaines. L'artère iliaque a été abrasée à l'aide d'un ballonnet de latex (4F) par cinq inflations successives. Les animaux ont de nouveau été soumis à un régime hypercholestérolémiant pendant six semaines. Le transfert artériel a été effectué par voie percutanée, selon la procédure précédemment décrite, au niveau de l'artère lésée. L'adénovirus Ad-RSV-TK ($4 \cdot 10^9$ pfu dans 40 μ l de tampon phosphate) a donc été déposé sur un cathéter à ballonnet préalablement enduit d'hydrogel (Hydroplus, Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Watertown, MA) (Riessen et al., Hum. Gene Ther. 4 (1993) 749). Le cathéter utilisé est un cathéter à ballonnet de 2 cm de longueur, et de diamètre de 2,5 mm.

Basé sur une lésion double, consécutive à l'abrasion et l'angioplastie, ce modèle de resténose, et non pas uniquement de sténose, permet d'évaluer l'efficacité du transfert adénoviral d'un gène suicide dans une artère athéromateuse.

A la lumière des données expérimentales in vitro et afin de vérifier la sélectivité du traitement par Ad-RSV-TK, les animaux ont été divisés en deux groupes, traités ou non par ganciclovir. Le traitement par ganciclovir a été prolongé pendant cinq jours (du deuxième au septième jour suivant l'angioplastie) à raison de 2x25 mg/kg/jour.

Analyse morphométrique :

Six semaines après l'angioplastie, les animaux ont été sacrifiés par pentobarbital, les artères iliaques fixées et prélevées en vue de l'analyse morphométrique. Les contours de la lumière ainsi que des limitantes élastiques internes/externes ont été évalués après coloration à l'orcéine/hématoxyline. Au total, six blocs ont été analysés par artère, dont 4 compris dans la zone d'angioplastie et deux immédiatement en amont et en aval de cette zone. Pour chaque bloc, trois sections adjacentes ont été analysées. Brièvement, différents paramètres tels que le diamètre luminal, le rapport intima/média ont été calculés. Les échantillons pour lesquels ces contours n'ont pu être mis en évidence, en raison d'une rupture de la limitante élastique interne ou d'une occlusion thrombotique, ont été exclus.

L'analyse morphométrique met en évidence un rapport intima/média élevé dans le groupe contrôle ayant été soumis au transfert adénoviral par angioplastie mais

non traité par ganciclovir ($5,73 \pm 0,81$, $n=3$). La sévérité de la lésion permet donc d'évaluer l'efficacité d'un traitement par transfert de gène sur une artère pathologique. En outre, ainsi que le montre l'étude immunohistochimique, les lésions induites dans ce modèle animal sont riches en macrophages mais également riches en cellules musculaires lisses qui constituent le cible thérapeutique du transfert génique.

5 L'ensemble de ces données soulignent l'intérêt du modèle utilisé qui ne repose pas sur une simple abrasion endothéliale au niveau d'une artère saine et par conséquent mime, du moins partiellement, la pathologie de la resténose post-angioplastie chez l'homme.

L'analyse morphométrique montre que le rapport intima/média est réduit de 42% ($p<0.05$) dans le groupe d'animaux soumis à la combinaison Ad-RSV-TK/ganciclovir ($3,30 \pm 1,26$, $n=6$). La réduction significative de ce paramètre démontre que le transfert local du gène TK par adénovirus recombinant, en association avec l'administration de ganciclovir, constitue une approche thérapeutique prometteuse comme traitement préventif de la resténose post-angioplastie.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement
5 de la resténose.
2. Utilisation d'un adénovirus recombinant défectif comportant un gène suicide pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la resténose par transfert sélectif dudit gène dans les cellules musculaires lisses de la
10 plaque athéromateuse.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le gène suicide est choisi parmi le gène de la thymidine kinase et le gène de la cytosine désaminase.
15
4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le gène suicide est le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (HSV-1 TK).
5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce
20 que le gène suicide est placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les cellules infectées.
6. Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs viraux, de préférence le promoteur LTR-RSV et CMV.
25
7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et le gène suicide.
- 30 8. Utilisation selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène suicide, et dans lequel le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

9 Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène suicide, et dans lequel le gène E1 et le gène E4 est rendu non fonctionnel.

5 10. Utilisation selon la revendication 9 caractérisée en ce que l'adénovirus comprend les ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène suicide, et dans lequel tout ou partie des régions E1 et E4 sont délétées.

10 11. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine humaine, choisi de préférence parmi les sérotypes Ad2 et Ad5.

15 12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce que l'adénovirus est un adénovirus d'origine animale, choisi de préférence parmi les adénovirus canins

13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisée en ce que l'adénovirus est imbibé dans un hydrogel.

20 14. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que l'hydrogel est déposé sur un cathéter à ballonnet.

25 15. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce que l'adénovirus est administré par l'intermédiaire d'un cathéter à ballonnet de type cathéter à perfusion.

16. Utilisation selon la revendication 15 caractérisée en ce que l'adénovirus est administré par l'intermédiaire d'un cathéter de type cathéter à ballonnet à canaux.

30 17. Utilisation selon la revendication 15 caractérisée en ce que l'adénovirus perfusé par l'intermédiaire d'un cathéter de type cathéter à ballonnet à perfusion est imbibé dans un hydrogel

35 18. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisée en ce que l'adénovirus est imbibé dans du poloxamère

19. Utilisation selon la revendication 15 caractérisée en ce que l'adénovirus perfusé par l'intermédiaire d'un cathéter de type cathéter à ballonnet à perfusion est imbibé dans du poloxamère.

5 20. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus recombinant défectif imbibé dans un hydrogel.

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 caractérisée en ce que l'adénovirus recombinant défectif comporte un gène suicide.

10

22. Dispositif pour l'administration de gènes par voie percutanée caractérisé en ce qu'il comprend un cathéter à ballonnet enduit d'un hydrogel, l'hydrogel étant imbibé d'un adénovirus recombinant défectif comportant le dit gène

15

23. Dispositif selon la revendication 22 caractérisée en ce que l'administration de gènes est réalisée de manière sélective au niveau de la plaque athéromateuse.

24. Dispositif selon la revendication 23 caractérisée en ce que l'administration de gènes est réalisée de manière sélective au niveau des cellules musculaires lisses.

20

25. Dispositif selon la revendication 24 caractérisée en ce que lors de l'administration de gènes celle-ci se fait avec une sélectivité supérieure à 95%.

25 26. Dispositif selon les revendications 23 à 25 caractérisée en ce que l'administration de gènes est suivie d'un traitement au ganciclovir.

27. Dispositif selon la revendication 26 caractérisée en ce que le pourcentage de cellules infectées est supérieur ou égal à 0.2%.

30

28. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration de gènes par voie percutanée au moyen d'un cathéter à ballonnet enduit d'un hydrogel, l'hydrogel étant imbibé d'un adénovirus recombinant défectif comportant le dit gène.

29. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 28 caractérisée en ce que l'administration de gènes se fait de manière selective au niveau de la plaque athéromateuse.

5 30. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 29 caractérisée en ce que l'administration de gènes se fait de manière selective au niveau des cellules musculaires lisses.

10 31. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 30 caractérisée en ce que l'administration de gènes se fait avec une selectivité supérieure à 95%.

15 32. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 31 caractérisée en ce que l'administration de gènes suicide TK est suivie d'un traitement au ganciclovir.

33. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 32 caractérisée en ce qu'elle induit un effet "bystander".

20 34. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 33 caractérisée en ce que cet effet bystander induit permet une efficacité thérapeutique même avec un faible pourcentage de cellules infectées.

25 35. Méthode de traitement thérapeutique de la resténose selon la revendication 34 caractérisée en ce que le pourcentage de cellules infectées est supérieur ou égal à .02%.

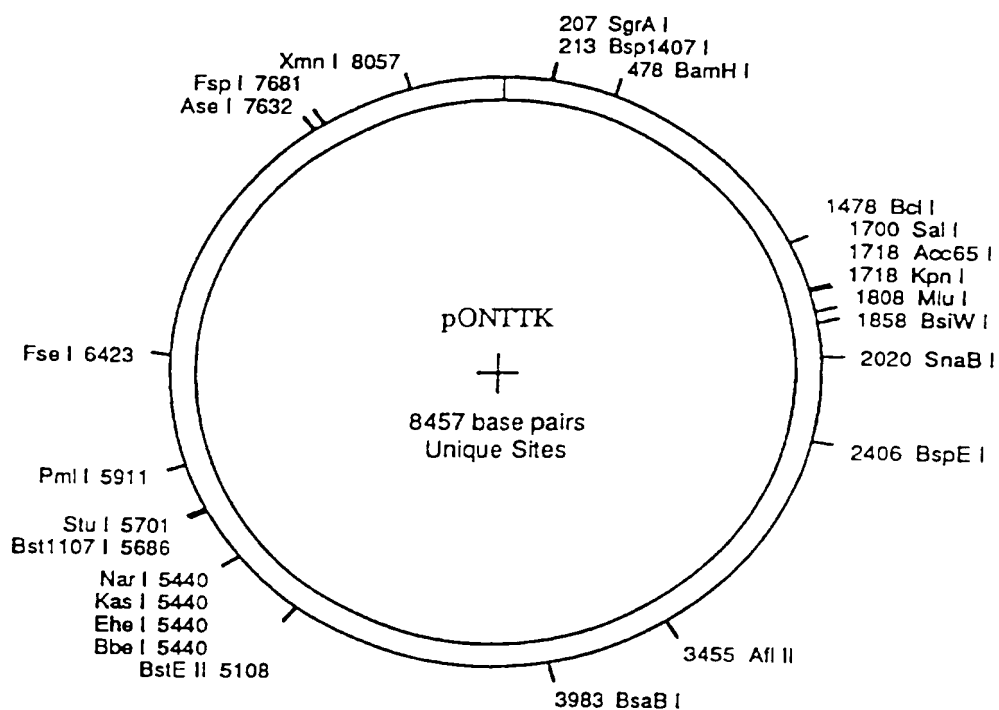


Figure 1

2/4

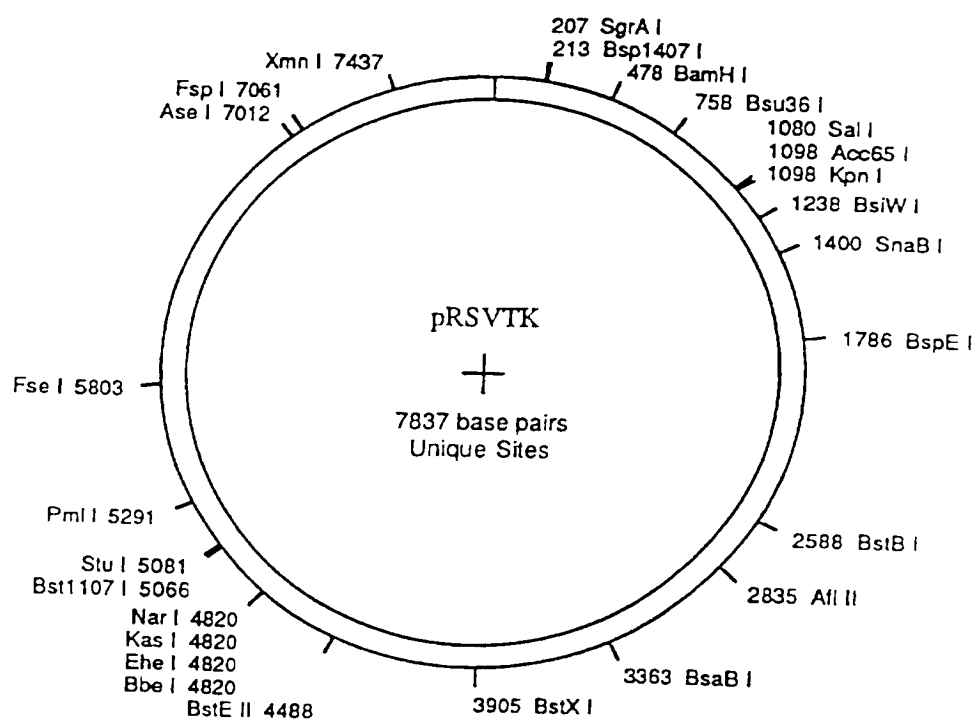


Figure 2

3/4

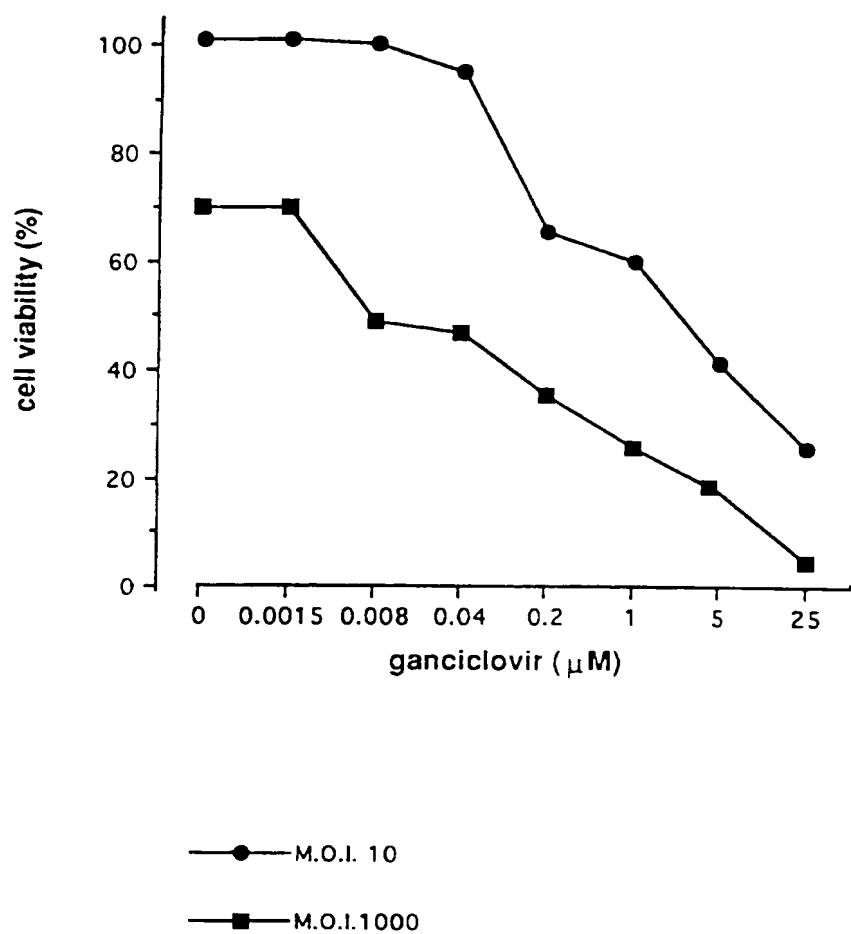


Figure 3

4/4

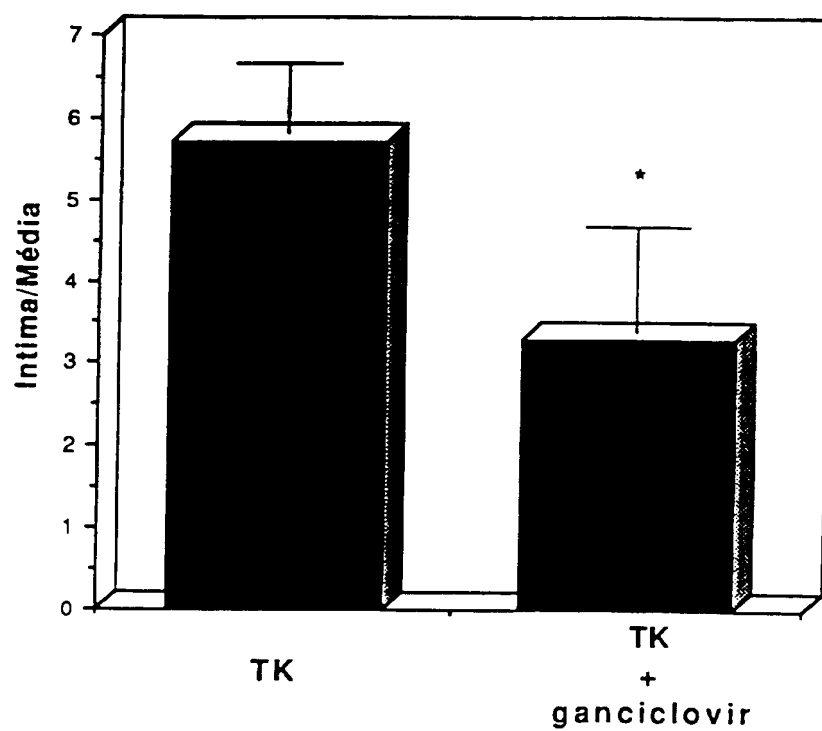


Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 A61L29/00 C12N7/01 C07K14/035
C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCIENCE, vol. 265, 5 August 1994 LANCASTER, PA US, pages 781-784, OHNO, T. ET AL. 'Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury'	1-5
Y	see the whole document ---	13-35
X	JOURNAL OF AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 23, no. 6, May 1994 pages 1278-1288, EPSTEIN, S.E. ET AL. 'The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty' see page 1283, column 2, line 28 - page 1284, column 1, line 33 ---	1-5
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 1995

Date of mailing of the international search report

01.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 95/01074

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 0 SPEC, no. ISS, February 1994 page 372A STEG, P. G. ET AL. 'Arterial endothelium abrasion permits adenovirus-mediated gene transfer to medial smooth muscle cells' * Résumé 949-110 * & 43rd Annual Scientific session of the American College of Cardiology, Atlanta, USA 13 au 17 mars 1993	13-35
X	---	
X	CIRCULATION, vol. 88, no. 4 P2, October 1993 page 1660 STEG, P. G. ET AL. 'Local delivery of adenovirus for percutaneous arterial gene transfer. A comparison of double and hydrogel-coated balloons'	20,22,24
Y	abstract 3554	13-35
X	---	
X	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 0 SPEC, no. ISS, February 1994 page 235A FELDMAN L. J. ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel coated balloon : A histochemical and PCR analysis.'	20,22,24
Y	abstract 906-34	13-35
	& 43rd Annual Scientific session of the American College of Cardiology, Atlanta, USA 13 au 17 mars 1993	
X	---	
X	CIRCULATION, vol. 89, no. 5, May 1994 pages 2190-2197, WILLARD, J.E. ET AL. 'Genetic modification of the vessel wall. Comparison of surgical and catheter-based techniques for delivery of recombinant adenovirus'	20,22
Y	see the whole document	13-35

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 95/01074

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 4 P2, October 1994 page I-292 GUZMAN, R.J. ET AL. 'Inhibition of in vivo neointimal proliferation using adenoviral gene transfer of the Herpes Simplex Thymidine Kinase gene' see Abstract 1569 ---	1
X	CIRCULATION, vol. 88, no. 6, December 1993 pages 2838-2848, GUZMAN, R.J. ET AL. 'Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima' see page 2838, column 1, paragraph 2 - column 2, line 3 see page 2848, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2 ---	1,2,5,6
X,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 5, November 1994 FRENCH, B.A. ET AL. 'Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis' see page 2411, column 2, paragraph 4 - page 2412, column 1, paragraph 2 ---	1-5,7,11
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 91, October 1994 WASHINGTON US, pages 10732-10736, GUZMAN, R.J. ET AL. 'In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene' see the whole document ---	1-5
Y	WO,A,93 08845 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 13 May 1993 cited in the application see page 14, line 18 - page 15, line 13; claims 1-4,14-18; examples 2,3 ---	15,21
P,X	WO,A,95 10623 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, USA) 20 April 1995 see the whole document ---	1-5
E	WO,A,95 25807 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 28 September 1995 see the whole document ---	1
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/FR 95/01074

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 11506 (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 26 May 1994 see page 4, line 1 - line 31 ---	1,5,6,11
P,A	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 January 1995 see the whole document ---	6-12
P,X	LA RECHERCHE, vol. 26, no. 274, April 1995 pages 452-454, ARDITI, S. 'Thérapie génique contre infarctus' see the whole document ---	1-14
Y,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 4, October 1994 pages 1648-1656, STEG, P. G. ET AL. 'Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector' see the whole document ---	13-35
Y,P	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 1, January 1995 pages 41-53, MARCH, K.L. ET AL. 'Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells: modulation by Poloxamer 407 and implication for cardiovascular gene therapy' see the whole document ---	13-35
T	WO,A,95 24929 (BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 21 September 1995 see the whole document -----	13-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 95/01074

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28-35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claims 28 to 35 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Initial Application No
PCT/FR 95/01074

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9308845	13-05-93	AU-A- 3129993 EP-A- 0558697 NO-A- 934828	07-06-93 08-09-93 24-02-94
WO-A-9510623	20-04-95	AU-B- 8017394	04-05-95
WO-A-9525807	28-09-95	NONE	
WO-A-9411506	26-05-94	AU-B- 5609394 CA-A- 2149771 EP-A- 0668913	08-06-94 26-05-94 30-08-95
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664 FR-A- 2718749 AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 NO-A- 950939 PL-A- 308122	20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 23-08-95 13-04-95 10-03-95 24-07-95
WO-A-9524929	21-09-95	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 95/01074

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 A61L29/00 C12N7/01 C07K14/035
C12N9/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SCIENCE, vol. 265, 5 Août 1994 LANCASTER, PA US, pages 781-784, OHNO, T. ET AL. 'Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury'	1-5
Y	voir le document en entier ---	13-35
X	JOURNAL OF AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 23, no. 6, Mai 1994 pages 1278-1288, EPSTEIN, S.E. ET AL. 'The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty' voir page 1283, colonne 2, ligne 28 - page 1284, colonne 1, ligne 33 ---	1-5
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Novembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 95/01074

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 0 SPEC, no. ISS, Février 1994 page 372A STEG, P. G. ET AL. 'Arterial endothelium abrasion permits adenovirus-mediated gene transfer to medial smooth muscle cells' * Résumé 949-110 * & 43rd Annual Scientific session of the American College of Cardiology, Atlanta, USA 13 au 17 mars 1993</p>	13-35
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>CIRCULATION, vol. 88, no. 4 P2, Octobre 1993 page 1660 STEG, P. G. ET AL. 'Local delivery of adenovirus for percutaneous arterial gene transfer. A comparison of double and hydrogel-coated balloons' * Résumé 3554 *</p>	20,22,24
Y	<p style="text-align: center;">---</p> <p>JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 0 SPEC, no. ISS, Février 1994 page 235A FELDMAN L. J. ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel coated balloon : A histochemical and PCR analysis.' * Résumé 906-34 *</p>	13-35
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>CIRCULATION, vol. 89, no. 5, Mai 1994 pages 2190-2197, WILLARD, J.E. ET AL. 'Genetic modification of the vessel wall. Comparison of surgical and catheter-based techniques for delivery of recombinant adenovirus' voir le document en entier</p>	20,22
Y	<p style="text-align: center;">---</p>	13-35
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 95/01074

C(nate) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 4 P2, Octobre 1994 page I-292 GUZMAN, R.J. ET AL. 'Inhibition of in vivo neointimal proliferation using adenoviral gene transfer of the Herpes Simplex Thymidine Kinase gene' see Abstract 1569 ---	1
X	CIRCULATION, vol. 88, no. 6, Décembre 1993 pages 2838-2848, GUZMAN, R.J. ET AL. 'Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima' voir page 2838, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, ligne 3 voir page 2848, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, alinéa 2 ---	1,2,5,6
X,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 5, Novembre 1994 FRENCH, B.A. ET AL. 'Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis' voir page 2411, colonne 2, alinéa 4 - page 2412, colonne 1, alinéa 2 ---	1-5,7,11
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 91, Octobre 1994 WASHINGTON US, pages 10732-10736, GUZMAN, R.J. ET AL. 'In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene' voir le document en entier ---	1-5
Y	WO,A,93 08845 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 13 Mai 1993 cité dans la demande voir page 14, ligne 18 - page 15, ligne 13; revendications 1-4,14-18; exemples 2,3 ---	15,21
P,X	WO,A,95 10623 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, USA) 20 Avril 1995 voir le document en entier ---	1-5
E	WO,A,95 25807 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 28 Septembre 1995 voir le document en entier ---	1
-/--		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 95/01074

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,94 11506 (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 26 Mai 1994 voir page 4, ligne 1 - ligne 31 ---	1,5,6,11
P,A	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 Janvier 1995 voir le document en entier ---	6-12
P,X	LA RECHERCHE, vol. 26, no. 274, Avril 1995 pages 452-454, ARDITI, S. 'Thérapie génique contre infarctus' voir le document en entier ---	1-14
Y,P	CIRCULATION, vol. 90, no. 4, Octobre 1994 pages 1648-1656, STEG, P. G. ET AL. 'Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector' voir le document en entier ---	13-35
Y,P	HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 1, Janvier 1995 pages 41-53, MARCH, K.L. ET AL. 'Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells: modulation by Poloxamer 407 and implication for cardiovascular gene therapy' voir le document en entier ---	13-35
T	WO,A,95 24929 (BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 21 Septembre 1995 voir le document en entier -----	13-35

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale n°

PCT/FR95/01074

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 28-35 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 28 à 35 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 95/01074

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9308845	13-05-93	AU-A- 3129993 EP-A- 0558697 NO-A- 934828	07-06-93 08-09-93 24-02-94
WO-A-9510623	20-04-95	AU-B- 8017394	04-05-95
WO-A-9525807	28-09-95	AUCUN	
WO-A-9411506	26-05-94	AU-B- 5609394 CA-A- 2149771 EP-A- 0668913	08-06-94 26-05-94 30-08-95
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664 FR-A- 2718749 AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 NO-A- 950939 PL-A- 308122	20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 23-08-95 13-04-95 10-03-95 24-07-95
WO-A-9524929	21-09-95	AUCUN	